

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
23 décembre 2015 (23.12.2015)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2015/193588 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12P 19/14 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2015/051557

(22) Date de dépôt international :
12 juin 2015 (12.06.2015)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
14 55701 20 juin 2014 (20.06.2014) FR

(71) Déposants : IFP ENERGIES NOUVELLES [FR/FR]; 1 & 4, avenue Bois Préau, 92500 Rueil Malmaison (FR). PROTÉUS [FR/FR]; ZI de la Vigne aux Loups 23 rue Bossuet, 91160 Longjumeau (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS - [FR/—]; 3, rue Michel Ange, Paris, 75016 (FR).

(72) Inventeurs : PERSILLON, Cécile; 3 rue de la comtesse, 30000 Nîmes (FR). ULLMANN, Christophe; 5, rue Deparcieux, 30000 Nîmes (FR). AYRINHAC, Céline; 7 lot le Coteau, 30350 Domessargues (FR). BONZOM, Olivier; 5 rue de la servie, 30000 Nîmes (FR). MARGEOT, Antoine; 212 rue Marcadet, 75018 Paris (FR). MATHIS, Hugues; 30 place Fulgence Bienvenue, 77600 Bussy Saint Georges (FR). FORT, Sébastien; 55 Chemin du Parc Uriage, 38410 Vaulnaveys-le-Haut (FR). ARMAND, Sylvie; 23 rue Marquian, 38100 Grenoble (FR). PRADEAU, Stéphanie; Lieu-dit Fugières, 38350 Saint-Honoré (FR).

(74) Mandataire : BERNARDI, Céline; CABINET PLASSE-RAUD, 52 rue de la Victoire, 75440 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : VARIANTS OF EXOGLUCANASES HAVING IMPROVED ACTIVITY AND USES THEREOF

(54) Titre : VARIANTS D'EXOGLUCANASES A ACTIVITE AMELIOREE ET LEURS UTILISATIONS

(57) Abstract : The present invention relates to the expression and optimisation of enzymes involved in the breakdown of lignocellulosic biomass. The present invention specifically relates to variants of the exoglucanase 2 of *Trichoderma reesei*, as well as to the use of said variants with improved efficiency in methods for breaking down cellulose and for producing biofuel.

(57) Abrégé : La présente invention porte sur l'expression et l'optimisation d'enzymes impliquées dans la dégradation de la biomasse lignocellulosique. La présente invention porte plus particulièrement sur des variants de l'exoglucanase 2 de *Trichoderma reesei*, ainsi que sur l'utilisation de ces variants à performance améliorée dans des procédés de dégradation de la cellulose et de production de biocarburant.



WO 2015/193588 A1

VARIANTS D'EXOGLUCANASES A ACTIVITE AMELIOREE ET LEURS UTILISATIONS

La possibilité de produire de l'éthanol à partir de la cellulose a reçu beaucoup
5 d'attention en raison de la disponibilité de grandes quantités de matière première ainsi
que de l'intérêt de l'éthanol à titre de carburant. Les matières premières naturelles
cellulosiques pour un tel processus sont désignées par le terme "biomasse". De
nombreux types de biomasse, par exemple le bois, les résidus agricoles, les cultures
herbacées et les déchets solides municipaux, ont été considérés comme des matières
10 premières potentielles pour la production de biocarburant. Ces matières sont constituées
principalement de cellulose, d'hémicellulose et de lignine.

La cellulose est un polymère constitué de molécules de glucose reliées par des
liens beta 1-4, qui sont très résistants à la dégradation ou à la dépolymérisation. Une fois
15 la cellulose convertie en glucose, celui-ci est facilement fermenté en biocarburant, par
exemple l'éthanol, en utilisant une levure.

Les plus anciennes méthodes étudiées pour convertir la cellulose en glucose sont
basées sur l'hydrolyse acide. Ce processus peut se faire en présence d'acides concentrés
20 ou dilués. Cependant, plusieurs inconvénients tels que la mauvaise récupération de
l'acide lors de l'utilisation d'acides concentrés et la faible production de glucose dans le
cadre de l'utilisation d'acides dilués nuisent à l'économie du processus d'hydrolyse
acide.

25 Pour surmonter les inconvénients du processus d'hydrolyse acide, les processus
de conversion de la cellulose ont porté plus récemment sur l'hydrolyse enzymatique, à
l'aide d'enzymes de type cellulase. Cette hydrolyse enzymatique de la biomasse
lignocellulosique (par exemple, la cellulose) présente cependant l'inconvénient d'être
un procédé industriel coûteux. De ce fait, il est nécessaire d'utiliser des souches de
30 microorganismes sécréteurs de cellulases de plus en plus performantes. À ce titre,
beaucoup de microorganismes comportent des enzymes qui hydrolysent la cellulose,
tels que les champignons *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Fusarium* ainsi que des
bactéries telles que *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Cellulomonas* et *Streptomyces*. Les
enzymes sécrétées par ces microorganismes possèdent trois types d'activités utiles dans

la conversion de la cellulose en glucose et se divisent en trois groupes: les endoglucanases, qui attaquent les fibres de celluloses aléatoirement en interne, les exoglucanases qui vont attaquer les extrémités des fibres en libérant du cellobiose, et les beta-glucosidases qui vont hydrolyser ce cellobiose en glucose. D'autres classes
5 d'enzymes telles que les hémicellulases ou la classe d'enzymes récemment découverte des polysaccharides mono-oxygénases peuvent jouer également un rôle dans l'efficacité de l'hydrolyse.

Il y a un intérêt industriel fort pour la diminution du coût de l'hydrolyse enzymatique, et cette diminution passe par l'utilisation d'une dose réduite d'enzymes et
10 donc des cocktails d'enzymes plus efficaces. En conséquence, plusieurs demandes de brevets décrivent des enzymes naturelles aux capacités supérieures à celles de *Trichoderma reesei*, ou des variants améliorés par génie génétique. On peut citer les demandes de brevet US2010304464, WO2010066411 et WO2013029176 concernant
15 les exoglucanases, les demandes WO2007109441, WO2012149192 et WO2010076388 concernant les endoglucanases, les demandes WO2010029259, WO2010135836 ou WO2010022518 concernant les beta-glucosidases, ou encore les demandes WO12135659, WO12149344 concernant les polysaccharides mono-oxygénases.

20 Les enzymes hydrolysant la biomasse lignocellulosique sont classées dans le système CAZy (Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. Nucleic acids research, 37, D233–8) sur des critères principalement structuraux. Les exoglucanases peuvent appartenir aux familles GH 6, 7,
25 9, 48, et 74.

Pour qu'une hydrolyse de la biomasse lignocellulosique soit efficace et économiquement rentable, le mélange enzymatique doit comporter des proportions équilibrées d'enzymes ayant des activités enzymatiques diverses, entre autres, mais non
30 exclusivement, du type exoglucanases, endoglucanases, xylanases et beta-glucosidases. A titre d'exemple, dans les mélanges natifs de *Trichoderma reesei* on constate généralement la présence de 60-70% d'exoglucanases, 15-20% d'endoglucanases, quelques pourcentages d'hémicellulases et environ 5-10% de beta-glucosidases. Ce mélange convient pour hydrolyser la majorité des substrats prétraités (ex. type paille de

blé explosée à la vapeur en conditions acides) avec des rendements acceptables. La proportion déjà importante des exoglucanases dans le mélange indique qu'il sera difficile d'augmenter la quantité de ces enzymes sans pénaliser les autres activités. Le génome de *Trichoderma reesei* comporte deux exoglucanases, l'une issue de la famille 6 (CBH2, cel6a) et l'autre issue de la famille 7 (CBH1, Cel7a). Elles hydrolysent en cellobiose respectivement les extrémités non réductrices (EC3.2.1.176) et réductrices (EC3.2.1.91) de la cellulose.

L'hydrolyse et la fermentation peuvent être réalisées suivant différents schémas. Le plus courant consiste en une hydrolyse et une fermentation séparées (SHF – Separate Hydrolysis and Fermentation). Cette méthode permet d'optimiser chaque étape par le maintien des conditions optimales de réaction. Cette fermentation s'effectue de manière extemporanée, à une température comprise entre environ 28°C et environ 30°C, tandis que l'hydrolyse a lieu généralement à une température d'au moins 45°C. Cependant, en SHF, les sucres libérés en fin de réaction sont présents à très forte concentration et entraînent une inhibition des enzymes, ralentissant l'efficacité du procédé. Pour éviter ces inconvénients, un autre type de procédé peut être envisagé. En SSF, les deux étapes (hydrolyse et fermentation des hexoses) ont lieu de manière simultanée, empêchant l'accumulation des sucres à des concentrations inhibitrices pour les enzymes. Les coûts d'investissement sont également réduits grâce à l'utilisation d'un seul réacteur. Le taux d'hydrolyse est plus élevé suite à l'absence d'inhibition car les sucres libérés sont utilisés immédiatement pour la fermentation en éthanol. Dans cette méthode, la température du réacteur constitue nécessairement un compromis entre les températures optimales d'hydrolyse et de fermentation, typiquement entre environ 30°C et environ 35°C. Cependant, à une telle température, l'activité des enzymes cellulolytiques est diminuée de 30% environ.

La SSF permet également l'expression d'enzymes dégradant la cellulose dans l'organisme fermentant les sucres, ce qui permet de limiter, ou dans un cas extrême de supprimer le recours aux enzymes produites lors d'une étape séparée.

En conséquence, l'obtention d'enzymes maintenant une activité exoglucanase efficace aux températures optimales d'hydrolyse et de fermentation (soit entre 30°C et 50°C) tout en gardant la proportion de l'ensemble des enzymes du mélange serait un

gain significatif pour le procédé de conversion de biomasse lignocellulosique en biocarburant.

Les inventeurs ont développé un polypeptide ayant une activité exoglucanase améliorée, notamment par rapport à l'activité exoglucanase de la protéine de référence CBH2 de séquence SEQ ID NO :2. CBH2 correspond à l'exoglucanase 2 de *Trichoderma reesei*.

Dans cette optique, les déposants, ont eu le grand mérite de trouver, après de nombreuses recherches, un polypeptide isolé ou purifié ayant une activité exoglucanase améliorée par rapport à l'activité exoglucanase de la protéine de référence CBH2 (SEQ ID NO :2).

L'invention concerne donc un polypeptide choisi dans le groupe consistant en :

- i. une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :26 et SEQ ID NO :28 ; et
- ii. une séquence d'acides aminés présentant un pourcentage de résidus identiques par rapport à la séquence SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :26 et SEQ ID NO :28, (pourcentage d'identité) d'au moins 70%, préférentiellement d'au moins 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%.

De préférence, le polypeptide tel que décrit précédemment est caractérisé en ce que son expression dans un organisme fermentaire est au moins égale à l'expression de la protéine de référence CBH2 (SEQ ID NO :2).

Selon l'invention, le pourcentage d'identité d'une séquence donnée par rapport à SEQ ID NO :4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 ou 28 correspond au nombre de résidus identiques entre cette séquence donnée et SEQ ID NO :4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 ou 28 divisé par le nombre de résidus dans SEQ ID NO :4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 ou 28.

Dans un mode de réalisation préféré, le polypeptide de l'invention a une activité exoglucanase améliorée d'au moins 10%, préférentiellement d'au moins 20%, préférentiellement d'au moins 30%, encore plus préférentiellement d'au moins 40%, à
5 une température d'environ 35°C et/ou d'environ 50°C, par rapport à l'activité exoglucanase du polypeptide CBH2 de séquence d'acides aminés SEQ ID N°2.

L'homme du métier pourra par exemple déterminer l'augmentation ou autrement dit l'amélioration de l'activité enzymatique soit à l'aide d'un substrat comme la
10 cellulose Avicel®, la cellulose PASC ou avec un substrat chromogénique (p-Nitrophenyl glycoside), par exemple le pNP lactose. L'activité enzymatique sera respectivement révélée par dosage colorimétrique des sucres réducteurs ou bien du nitrophénol libérés.

15 Un exemple de protocole, que l'homme du métier pourra utiliser pour déterminer si un polypeptide selon l'invention présente une activité enzymatique améliorée par rapport à celle de la protéine de référence CBH2 (SEQ ID NO :2), est le suivant :

- préparation d'une culture stock de *Y. lipolytica* exprimant une enzyme
20 recombinante selon l'invention pendant toute la nuit à 28°C ;
- ensemencement d'un milieu d'expression avec un volume de culture stock permettant d'avoir une densité optique à 600 nm égale à 0.2 au début de la culture ;
- culture desdites cellules à 28°C pendant 96 heures ;
- 25 - centrifugation à 8000 rpm pendant 5 minutes ;
- incubation de 100 µL de surnageant avec 100 µL de tampon citrate phosphate 0.1 M pH 6 contenant 1 % de cellodextrines (CD) réduites pendant 4 heures à 35°C et 50°C ;
- prélèvement de 100 µL de réaction ;
- 30 - ajout de 100 µL de réactif DNS ;
- incubation 5 minutes à 100°C ;
- incubation 3 minutes sur la glace ;
- centrifugation 10 minutes à 3000 rpm ;
- lecture de la DO à 540 nm sur 150 µL.

L'invention a également pour objet, un acide nucléique purifié ou isolé codant au moins un polypeptide tel que décrit précédemment. Le TABLEAU 1 ci-dessous comprend les identifications des séquences nucléiques et peptidiques pour le gène de référence CBH2 de *T. reesei*, les exoglucanases putatives de *Nectria haematococca* (NH) et de *Giberella zeae* (GZ), ainsi que pour les polypeptides et polynucléotides de l'invention.

TABLEAU 1

10

Clones	Acide nucléique	Polypeptide
CBH2 (sauvage)	SEQ ID NO :1	SEQ ID NO :2
35B7	SEQ ID NO :3	SEQ ID NO :4
95B7	SEQ ID NO :5	SEQ ID NO :6
100F11	SEQ ID NO :7	SEQ ID NO :8
139F12	SEQ ID NO :9	SEQ ID NO :10
157B11	SEQ ID NO :11	SEQ ID NO :12
161A1	SEQ ID NO :13	SED ID NO :14
161C12	SEQ ID NO :15	SED ID NO :16
189H8	SEQ ID NO :17	SEQ ID NO :18
196D9	SEQ ID NO :19	SEQ ID NO :20
198E11	SEQ ID NO :21	SEQ ID NO :22
251B4	SEQ ID NO :23	SEQ ID NO :24
251C4	SEQ ID NO :25	SEQ ID NO :26
382A2	SEQ ID NO :27	SED ID NO :28
Gène GZ	SEQ ID NO :29	SEQ ID NO :30
Gène NH-7	SEQ ID NO :31	SED ID NO :32

L'invention a également pour objet un acide nucléique purifié ou isolé codant au moins un polypeptide tel que décrit précédemment.

15

De préférence, ledit acide nucléique purifié ou isolé peut être choisi parmi les séquences suivantes: SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :7, SEQ ID NO :9,

SEQ ID NO :11; SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :15, SEQ ID NO :17, SEQ ID NO :19, SEQ ID NO :21, SEQ ID NO :23, SEQ ID NO :25 et SEQ ID NO :27.

5 Selon l'invention, l'acide nucléique tel que décrit précédemment pourra être lié opérationnellement à un promoteur, un terminateur ou toute autre séquence nécessaire à son expression dans une cellule hôte.

10 L'invention porte également sur un vecteur comprenant au moins un acide nucléique tel que décrit précédemment.

Selon l'invention, on entend par « vecteur » toute séquence d'ADN dans laquelle il est possible d'insérer des fragments d'acide nucléique étranger, les vecteurs permettant d'introduire de l'ADN étranger dans une cellule hôte. On peut citer de manière non-exhaustive comme vecteurs : les plasmides, les cosmides, les
15 chromosomes artificiels de levures (YAC), les chromosomes artificiels de bactéries (BAC), les chromosomes artificiels dérivés du bactériophage P1 (PAC) ou les vecteurs dérivés de virus.

Le vecteur selon l'invention pourra également porter un marqueur de sélection.
20 On entend par « marqueur de sélection » un gène dont l'expression confère aux cellules qui le contiennent une caractéristique permettant de les sélectionner. Il s'agit par exemple d'un gène de résistance aux antibiotiques.

L'invention a également pour objet une cellule hôte isolée comprenant soit au
25 moins l'un des polypeptides tels que décrit précédemment, soit au moins l'un des acides nucléiques tels que décrit précédemment soit au moins l'un des vecteurs tels que décrits précédemment.

L'homme du métier pourra introduire l'un des polypeptides, l'un des acides
30 nucléiques ou l'un des vecteurs tels que décrits précédemment dans la cellule hôte par des méthodes conventionnelles bien connues. Par exemple, on peut citer le traitement au chlorure de calcium, l'électroporation, l'utilisation d'un pistolet à particules.

Selon un mode de réalisation, l'homme du métier pourra introduire dans la cellule hôte et par des méthodes conventionnelles plusieurs copies d'un acide nucléique codant un polypeptide ayant une activité exoglucanase améliorée selon l'invention.

5 Selon un mode de réalisation, la cellule hôte isolée telle que décrite précédemment est choisie parmi *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Humicola*, *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* et *Saccharomyces*.

10

Selon un mode de réalisation préféré, la cellule hôte isolée telle que décrite précédemment est choisie parmi *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Myceliophthora thermopila*, *Chrysosporium*
15 *lucknowense*, *Neurospora crassa*, *Humicola grisae*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium oxalicum*, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium benjerinckii*, *Clostridium butylicum*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolityca* et *Saccharomyces cerevisiae*.

20

Selon un mode de réalisation préféré, la cellule hôte isolée telle que décrite précédemment est choisie parmi *Trichoderma reesei* et *Saccharomyces cerevisiae*.

L'invention a également pour objet l'utilisation de l'un quelconque des polypeptides décrits précédemment pour l'hydrolyse de la cellulose.

25

L'invention a également pour objet, l'utilisation de l'un quelconque des polypeptides décrits précédemment pour la production de biocarburant.

Selon l'invention, le terme biocarburant peut être défini comme étant tout
30 produit issu de la transformation de la biomasse et pouvant être utilisé à des fins énergétiques. D'une part et sans vouloir se limiter, on peut citer à titre d'exemple des biogaz, des produits pouvant être incorporés (éventuellement après transformation ultérieure) à un carburant ou être un carburant à part entière, tels que des alcools (l'éthanol, le butanol et/ou l'isopropanol selon le type d'organisme fermentaire utilisé),

des solvants (acétone), des acides (butyrique), des lipides et leurs dérivés (acides gras à courtes ou longues chaînes, esters d'acides gras), ainsi que l'hydrogène.

De manière préférée, le biocarburant selon l'invention est un alcool, par exemple l'éthanol, le butanol et/ou l'isopropanol. Plus préférentiellement, le biocarburant selon l'invention est l'éthanol.

Dans un autre mode de réalisation, le biocarburant est du biogaz.

Dans un autre mode de réalisation, le produit est une molécule intéressant l'industrie chimique, comme par exemple, un autre alcool tel que le 1,2-propane diol, le 1,3-propane diol, le 1,4-butane diol, le 2,3-butane diol, des acides organiques comme l'acide acétique, propionique, acrylique, butyrique, succinique, malique, fumarique, citrique, itaconique, ou des hydroxyacides comme l'acide glycolique, hydroxypropionique, ou lactique.

On décrit ci-dessous un mode de réalisation de production d'un cocktail enzymatique utile pour l'hydrolyse de la lignocellulose.

Les souches de champignons filamenteux, de préférence *Trichoderma*, plus préférentiellement *T. reesei*, capables d'exprimer au moins un polypeptide selon l'invention sont cultivées en fermenteurs, en présence d'un substrat carboné, tel que le lactose ou le glucose, choisi pour la croissance du microorganisme. Dans un mode de réalisation, ce substrat carboné, selon sa nature, est introduit dans le fermenteur avant stérilisation ou est stérilisé séparément et introduit dans le fermenteur après stérilisation de ce dernier pour obtenir une concentration initiale de 20 à 35 g / L.

Une solution aqueuse contenant le substrat choisi pour la production des enzymes est ensuite ajoutée. Une composition enzymatique agissant sur la biomasse lignocellulosique produite par les champignons est enfin récupérée par filtration du milieu de culture. Dans cette composition, on retrouve notamment, la beta-glucosidase, l'endoglucanase et l'exoglucanase selon l'invention.

Dans un mode de réalisation, la solution aqueuse contenant le substrat choisi pour la production des enzymes est préparée à la concentration de 200-250 g / L. Cette

solution contient en outre de préférence un substrat inducteur tel que le lactose. Cette solution aqueuse est injectée après l'épuisement du substrat carboné initial de façon à apporter une quantité optimisée, comprise entre 35 et 45 mg / g de cellules ("fed batch"). Pendant cette phase de "fed batch", la concentration résiduelle en sucre dans le milieu de culture est inférieure à 1 g / L et les enzymes agissant sur la biomasse lignocellulosique sont sécrétées par le champignon. Ces dernières peuvent être récupérées par filtration du milieu de culture.

L'invention a pour objet une composition enzymatique apte à agir sur la biomasse lignocellulosique, ladite composition enzymatique étant produite par des champignons filamenteux et comprenant au moins un polypeptide ayant une activité exoglucanase améliorée par rapport à l'activité exoglucanase de la protéine de référence CBH2. Par « champignons filamenteux », on entend notamment *Trichoderma*, plus préférentiellement *T. reesei*.

15

Enfin, l'invention a pour objet un procédé de production de biocarburant à partir de la biomasse comprenant les étapes successives suivantes :

- on met en suspension en phase aqueuse la biomasse à hydrolyser;
- on hydrolyse la biomasse lignocellulosique en présence d'une composition enzymatique telle que décrite précédemment de manière à produire un hydrolysât contenant du glucose;
- on fermente en présence d'un organisme fermentaire le glucose de l'hydrolysât de manière à produire un moût de fermentation;
- on sépare le biocarburant du moût de fermentation.

25

Dans un mode de réalisation, la biomasse à hydrolyser est mise en suspension en phase aqueuse à raison de 6 à 40 % de matière sèche, de préférence 20 à 30 %. Le pH est ajusté entre 4 et 5,5, de préférence entre 4,8 et 5,2 et la température entre 40°C et 60°C, de préférence entre 45°C et 50°C. La réaction d'hydrolyse est démarrée par l'ajout de la composition enzymatique agissant sur la biomasse lignocellulosique ; la quantité habituellement utilisée est de 10 à 30 mg de protéines excrétées par gramme de substrat prétraité ou moins. La réaction dure généralement de 15 à 48 heures. La réaction est suivie par dosage des sucres libérés, notamment le glucose. La solution de

30

sucres est séparée de la fraction solide non hydrolysée, essentiellement constituée de lignine, par filtration ou centrifugation et ensuite traitée dans une unité de fermentation.

5 Après l'étape de fermentation, le biocarburant est séparé du moût de fermentation par exemple par distillation.

Un autre objet de l'invention est un procédé de production de biocarburant à partir de la biomasse, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

- on met en suspension en phase aqueuse la biomasse à hydrolyser ;
- 10 - on ajoute simultanément à la suspension une composition enzymatique agissant sur la biomasse lignocellulosique telle que définie précédemment et un organisme fermentaire et on fermente le mélange de manière à produire un moût de fermentation ;
- on sépare le biocarburant du moût de fermentation.

15

De préférence, la composition enzymatique et l'organisme fermentaire sont ajoutés simultanément puis incubés à une température comprise entre 30°C et 35°C pour produire un moût de fermentation.

20

Selon ce mode de réalisation, la cellulose présente dans la biomasse est convertie en glucose, et en même temps, dans le même réacteur, l'organisme fermentaire (par exemple une levure) convertit le glucose en produit final selon un procédé de SSF (Simultaneous Saccharification and Fermentation) connu de l'homme du métier. Selon les capacités métaboliques et hydrolytiques de l'organisme fermentaire, le bon déroulement de l'opération peut nécessiter l'addition d'une quantité plus ou moins importante de mélange cellulolytique exogène.

25

Dans un autre mode de réalisation, l'organisme fermentaire produit le polypeptide objet de l'invention par sécrétion ou en surface de sa cellule, éventuellement conjointement à d'autres enzymes agissant sur la biomasse lignocellulosique, limitant ou supprimant ainsi le besoin en enzymes produites par le champignon filamenteux. De préférence, l'organisme fermentaire est une cellule hôte telle que décrite précédemment.

30

De préférence, les cellules hôtes avec la composition enzymatique et/ou l'organisme fermentaire, sont ajoutés puis incubés à une température comprise entre 30°C et 35°C pour produire un moût de fermentation.

5 L'utilisation du polypeptide présentant une meilleure activité exoglucanase selon la présente invention présente ainsi l'avantage d'obtenir un meilleur rendement de production de glucose tout en employant moins d'enzyme qu'auparavant, ce qui présente également un avantage économique.

10 D'autres aspects, objets, avantages et caractéristiques de l'invention, seront présentés à la lecture de la description non restrictive qui suit et qui décrit des modes de réalisation préférés de l'invention donnés par le biais d'exemples et des figures.

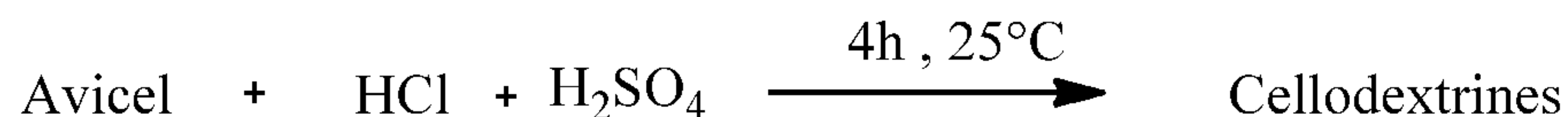
La Figure 1 est un spectre de masse MALDI-TOF représentant les cellodextrines
15 DP3 à DP11 utilisées pour le criblage.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 : Préparation de cellodextrines réduites (DP 3-11)

20

1-Hydrolyse de la cellulose (Adapté de Y-H. Percival Zhang, L. R. Lynd Analytical Biochemistry 322 (2003), 225-232.)



25

20 g de cellulose (Avicel. CAS Number 9004-34-6, Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier) sont ajoutés par portions et sous forte agitation à 160 mL d'une solution refroidie à 0°C d'acide chlorhydrique. De l'acide sulfurique, préalablement refroidi, est ajouté à la solution en plusieurs fois (4 x 10 mL). La réaction est maintenue sous agitation pendant 4 heures à 25°C avant d'être versée dans 1.8 L d'acétone
30 refroidie à -20°C. Après 2 heures d'agitation, le précipité est filtré, repris dans 400 mL d'acétone refroidie puis filtré à nouveau. Le solide est alors repris dans 600 mL d'eau, puis agité pendant une nuit pour solubiliser les cellodextrines. Après filtration du solide, la fraction soluble contenant les cellodextrines est neutralisée avec 300 g de résine Amberlite IRA 400 OH⁻ puis lyophilisée. Le lyophilisat est ensuite re-suspendu dans

500 mL de méthanol en présence d'ultra-sons pendant 30 minutes pour solubiliser les sucres de bas poids moléculaire avant d'être filtré puis lyophilisé à nouveau pour conduire à 6.8 g de cellodextrines de DP 3-11.

5 Pour le criblage, il a été choisi de travailler avec des substrats de plus haut poids moléculaire possible pour mimer au mieux la structure de la cellulose. Mais, les cellodextrines de haut poids moléculaire ne sont pas solubles, ceci empêchant une bonne reproductibilité des tests.

10 Une gamme de cellodextrines de DP 5-7 a donc été choisie, ce qui représente un bon compromis entre le haut poids moléculaire nécessaire et la solubilité des cellodextrines.

15 La Figure 1 présente un spectre de masse MALDI-TOF typiquement obtenu selon le procédé décrit ci-dessus.

La Figure 1 montre que les oligosaccharides isolés sont majoritairement de DP 5-7.

20

2-Réduction des cellodextrines

400 mg de borohydrure de sodium sont ajoutés à 2 g de cellodextrines DP 3-11 dilués dans 120 mL d'eau. Après 3 heures sous agitation à température ambiante, la
25 solution est neutralisée par addition de résine Amberlite H⁺ IR 120, filtrée, puis lyophilisée, pour conduire à 2 g de cellodextrines réduites de manière quantitative. (C. Schou, G. Rasmussen, M-B. Kaltoft, B. Henrissat, M. Schulein Eur. J. Biochem. 217, 947-953 (1993)).

30 Un dosage au BCA (acide bicinchoninique) des cellodextrines isolées permet de vérifier la réduction totale des extrémités réductrices (Y.-H. Percival Zhang, L. R. Lynd Biomacromolecules 2005, 6, 1510-1515).

EXEMPLE 2 : évolution par L-shuffling

La séquence du gène de la cellobiohydrolase 2 de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO :1) a été soumise à un tour de L-shuffling selon le procédé breveté décrit dans le brevet EP1104457 avec les gènes d'une exoglucanase putative de *Giberella zeae* PH-1 (SEQ ID NO :29) et d'une protéine hypothétique NECHADRAFT_73991 de *Nectria haematococca* mpVI (SEQ ID NO :31) présentant respectivement 63% et 69% d'homologie avec le gène parental CBH2 (SEQ ID NO :1). La séquence nucléique codant le peptide signal (SEQ ID NO :33) a été déléetée lors du clonage, et remplacée par celle de la levure, de séquence SEQ ID NO :34 (séquence du peptide signal correspondant : SEQ ID NO :35).

1-Criblage à haut débit

Un test de criblage à haut débit a été mis au point afin de sélectionner les meilleurs clones issus du L-shuffling, c'est-à-dire ceux présentant au moins 20% d'amélioration de l'activité cellobiohydrolase par rapport à l'enzyme de référence CBH2 (SEQ ID NO :2).

Le test de criblage à haut débit a été réalisé selon les étapes suivantes :

- isolement sur gélose des clones de *Y. lipolytica* exprimant les variants de L-shuffling de l'enzyme selon l'invention et mise en pré-cultures en milieu YNBcasa (yeast nitrogen base 1.7 g / L, NH₄Cl 10 g / L, glucose 10 g / L, casamino acids 2 g / L, pH7) desdites colonies pendant 36 heures à 28°C ;
- inoculation d'un milieu YTD (extrait de levure 10 g / L, tryptone 20 g / L, glucose 2.5 g / L, pH 6.8) additionné de tétracycline à 12.5 µg / mL à 5% avec la pré-culture puis incubation 20 heures à 28°C ;
- inoculation du milieu d'expression contenant l'inducteur (acide oléique) à raison de 20 g / L à 10% avec la culture précédente puis incubation 96 heures à 28°C ;
- centrifugation 5 minutes à 1500 rpm ;
- prélèvement de 100 µL de surnageant ;
- ajout de 100 µL de CD réduites à 1 g / L dans du tampon citrate phosphate 0.1 M à pH 6 ;
- incubation 24 heures à 35°C ;

- centrifugation pendant 5 minutes à 2500 rpm ;
- prélèvement de 80 µL de surnageant ;
- ajout de 80 µL de réactif DNS ;
- incubation 12 minutes à 105°C puis 5 minutes sur la glace ;
- 5 - lecture de la densité optique (DO) à 540 nm sur 120 µL.

Dans ces conditions de criblage, une amélioration de l'activité cellobiohydrolase (augmentation de la DO à 540 nm) par rapport à l'enzyme de référence CBH2 (SEQ ID NO :2) a été trouvée dans plusieurs clones. Parmi ces clones, on peut citer les clones 35B7 , 95B7, 100F11, 139F12, 157B11, 161A1, 161C12, 189H8, 196D9, 198E11, 10 251B4, 251C4 et 382A2, codant respectivement pour les enzymes SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :26 et SEQ ID NO :28.

15 **2-Détermination de l'amélioration de l'activité cellobiohydrolase**

2-1/ Sur le substrat cellodextrines réduites

Afin d'estimer le kcat relatif des variants sélectionnés au premier tour de L-shuffling par rapport à l'enzyme de référence CBH2 (SEQ ID NO :2), on procède de la 20 façon suivante :

- préparation d'une culture stock de *Y. lipolytica* exprimant une enzyme recombinante selon l'invention pendant toute la nuit à 28°C ;
- 25 ensemencement d'un milieu d'expression avec un volume de culture stock permettant d'avoir une densité optique à 600 nm égale à 0.2 au début de la culture ;
- culture desdites cellules à 28°C pendant 96 heures ;
- centrifugation à 8000 rpm pendant 5 minutes ;
- incubation de 100 µL de surnageant avec 100 µL de tampon citrate phosphate 0.1 M pH 6 contenant 1 % de CD réduites pendant 4 heures à 30 35°C et 50°C ;
- prélèvement de 100 µL de réaction ;
- ajout de 100 µL de réactif DNS ;
- incubation 5 minutes à 100°C ;

- incubation 3 minutes sur la glace ;
- centrifugation 10 minutes à 3000 rpm ;
- lecture de la densité optique à 540 nm sur 150 μ L.

Selon l'invention, le calcul des kcat est fait de la façon suivante :

- 5 - tracé de la courbe des DO à 540 nm en fonction du volume de surnageant de culture dans le test ;
- soustraction de la valeur du témoin négatif ;
- division par le coefficient de la gamme étalon de glucose (différentes quantités de glucose sont révélées avec le DNS) ;
- 10 - division par le temps de réaction (240 minutes).

Le tableau 2 présente la valeur des kcat ainsi que les facteurs d'amélioration obtenus pour les clones 35B7, 95B7, 100F11, 139F12, 157B11, 161A1, 161C12, 189H8, 196D9, 198E11, 251B4, 251C4 et 382A2 codant respectivement les enzymes SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :26 et SEQ ID NO :28 par rapport à la protéine de référence CBH2 (SEQ ID NO :2) dans ces conditions expérimentales.

TABLERAU 2 : amélioration de l'activité cellobiohydrolase sur CD réduites

	Clone	35°C		50°C	
		Kcat (min ⁻¹)	Facteur amélioration	Kcat (min ⁻¹)	Facteur amélioration
Clones du premier tour	35B7	0,166	3,8	0,2345	1,6
	95B7	0,287	6,6	0,715	4,8
	100F11	0,0508	1,2	0,1375	0,9
	139F12	0,1719	3,9	0,2328	1,6
	157B11	0,113	2,6	0,2061	1,4
	161A1	0,0577	1,3	0,1175	0,8
	161C12	0,1086	2,5	0,2162	1,4
	189H8	0,0872	2,0	0,1792	1,2
	196D9	0,1055	2,4	0,1969	1,3
	198E11	0,1218	2,8	0,1757	1,2
	251B4	0,0495	1,1	0,0865	0,6
	251C4	0,0623	1,4	0,1315	0,9
	382A2	0,315	7,2	0,552	3,7
Protéine de référence	cbh2	0,0436	1	0,1501	1

Les résultats montrent une amélioration d'activité enzymatique par rapport à l'enzyme de référence CBH2 (SEQ ID No :2) pour les clones 35B7, 95B7, 100F11, 139F12, 157B11, 161A1, 161C12, 189H8, 196D9, 198E11, 251B4, 251C4 et 382A2 codant respectivement pour les enzymes SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8, 5 SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :26 et SEQ ID NO :28 que ce soit à 35°C ou à 50°C.

2-2/ Sur le substrat Avicel

10

L'amélioration d'activité des clones 35B7, 95B7, 100F11, 139F12, 157B11, 161A1, 161C12, 189H8, 196D9, 198E11, 251B4, 251C4 et 382A2 codant respectivement pour les enzymes SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :14, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18, SEQ 15 ID NO :20, SEQ ID NO :22, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :26 et SEQ ID NO :28 a ensuite été confirmée sur un second substrat : Avicel.

La détermination de l'amélioration de l'activité sur ce substrat est effectuée en mesure en point final selon le protocole suivant :

- 20 - préparation d'une culture stock de *Y. lipolytica* exprimant une enzyme recombinante selon l'invention pendant toute la nuit à 28°C ;
- ensemencement d'un milieu d'expression avec un volume de culture stock permettant d'avoir une densité optique à 600 nm égale à 0.2 au début de la culture ;
- 25 - culture desdites cellules à 28°C pendant 96 heures ;
- centrifugation à 8000 rpm pendant 5 minutes ;
- incubation de 100 µL de surnageant avec 100 µL de tampon citrate phosphate 0.1 M pH 6 contenant 1 % d'Avicel pendant 18 heures à 35 et 50°C ;
- 30 - prélèvement de 100 µL de réaction ;
- ajout de 100 µL de réactif DNS ;
- incubation 5 minutes à 100°C ;
- incubation 3 minutes sur la glace ;
- centrifugation 10 minutes à 3000 rpm ;

- lecture de la densité optique à 540 nm sur 150 μ L.

Le tableau 3 présente la valeur des DO à 540 nm (après soustraction de la valeur du témoin négatif) ainsi que le facteur d'amélioration obtenus pour les clones 35B7, 95B7, 100F11, 139F12, 157B11, 161A1, 161C12, 189H8, 196D9, 198E11, 251B4, 251C4 et 382A2 dans ces conditions expérimentales.

TABLEAU 3 : amélioration de l'activité cellobiohydrolase sur Avicel

	Clone	35°C		50°C	
		Delta DO 540 nm	Facteur amélioration	Delta DO 540 nm	Facteur amélioration
Clones du premier tour	35B7	0,0617	1,0	0,0948	0,8
	95B7	0,0396	0,6	0,0555	0,4
	100F11	0,038	0,6	0,0159	0,1
	139F12	0,06	0,9	0,0365	0,3
	157B11	0,0456	0,7	0,0319	0,3
	161A1	0,0508	0,8	0,0237	0,2
	161C12	0,0564	0,9	0,0595	0,5
	189H8	0,0676	1,0	0,0573	0,5
	196D9	0,0565	0,9	0,0874	0,7
	198E11	0,0867	1,3	0,0546	0,4
	251B4	0,0765	1,2	0,0622	0,5
	251C4	0,063	1,0	0,0889	0,7
	382A2	0,2476	3,8	0,2256	1,8
Protéine de référence	cbh2	0,0644	1	0,1252	1

10

Les résultats du tableau 3 montrent une amélioration de l'activité enzymatique par rapport à l'enzyme de référence CBH2 (SEQ ID No :2) à 35°C pour les clones 198E11 et 251B4 (respectivement SEQ ID No :22 et 24) ainsi qu'une amélioration de l'activité enzymatique par rapport à l'enzyme de référence CBH2 (SEQ ID No :2) à 35°C et à 50°C pour le clone 382A2 (SEQ ID No :28).

15

REVENDICATIONS

1. Polypeptide isolé ou purifié caractérisé en ce qu'il a une activité
5 exoglucanase améliorée par rapport à l'activité exoglucanase de la protéine de
référence CBH2 de séquence SEQ ID NO :2, ledit polypeptide étant choisi dans
le groupe consistant en :
- i. une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID NO :4, SEQ ID
NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :14,
10 SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :20, SEQ ID NO :22, SEQ
ID NO :24, SEQ ID NO :26 et SEQ ID NO :28 ; et
- ii. une séquence d'acides aminés présentant, par rapport à la séquence SEQ
ID NO :6, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :10, SEQ ID NO :12, SEQ ID
NO :14, SEQ ID NO :16, SEQ ID NO :18, SEQ ID NO :20, SEQ ID
15 NO :22, SEQ ID NO :24, SEQ ID NO :26 et SEQ ID NO :28, un
pourcentage d'identité d'au moins 70%, préférentiellement d'au moins
75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%.
2. Acide nucléique purifié ou isolé, caractérisé en ce qu'il code au moins un
20 polypeptide selon la revendication 1.
3. Acide nucléique purifié ou isolé selon la revendication 2 choisi parmi les
séquences suivantes: SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :7, SEQ ID
NO :9, SEQ ID NO :11; SEQ ID NO :13, SEQ ID NO :15, SEQ ID NO :17 et
25 SEQ ID NO :19, SEQ ID NO :21, SEQ ID NO :23, SEQ ID NO :25 et SEQ ID
NO :27.
4. Vecteur caractérisé en ce qu'il comprend au moins un acide nucléique selon
l'une des revendications 2 ou 3.
- 30 5. Cellule hôte isolée caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide
selon la revendication 1, ou au moins un acide nucléique selon l'une des
revendications 2 ou 3, ou au moins un vecteur selon la revendication 4.

6. Cellule hôte isolée selon la revendication **5**, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Humicola*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Thermomonospora*, *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* et *Saccharomyces*.
7. Cellule hôte isolée selon l'une des revendications **5 ou 6**, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Neurospora crassa*, *Humicola grisae*, *Myceliophthora thermopila*, *Chrysosporium lucknowense*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium oxalicum*, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium benjerinckii*, *Clostridium butylicum*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolityca* et *Saccharomyces cerevisiae*.
8. Utilisation dudit polypeptide selon la revendication **1** pour l'hydrolyse de la cellulose.
9. Utilisation dudit polypeptide selon la revendication **1** pour la production de biocarburant.
10. Composition enzymatique apte à agir sur la biomasse lignocellulosique, ladite composition enzymatique étant produite par des champignons filamenteux et comprenant au moins un polypeptide selon la revendication **1**.
11. Procédé de production de biocarburant à partir de la biomasse lignocellulosique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :
 - on met en suspension en phase aqueuse la biomasse à hydrolyser ;
 - on hydrolyse la biomasse en présence d'une composition enzymatique selon la revendication **10** la biomasse lignocellulosique de manière à produire un hydrolysats contenant du glucose ;
 - on fermente en présence d'un organisme fermentaire le glucose de l'hydrolysats de manière à produire un moût de fermentation ;

- on sépare le biocarburant du moût de fermentation.

12. Procédé de production de biocarburant à partir de la biomasse, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes successives suivantes :

- 5
- on met en suspension en phase aqueuse la biomasse à hydrolyser ;
 - on ajoute simultanément à la suspension une composition enzymatique selon la revendication **10** et un organisme fermentaire et on fermente le mélange de manière à produire un moût de fermentation ;
 - on sépare le biocarburant du moût de fermentation.

10

13. Procédé selon l'une des revendications **11 ou 12**, dans lequel l'organisme fermentaire est une cellule hôte selon l'une des revendications **5 à 7**.

15

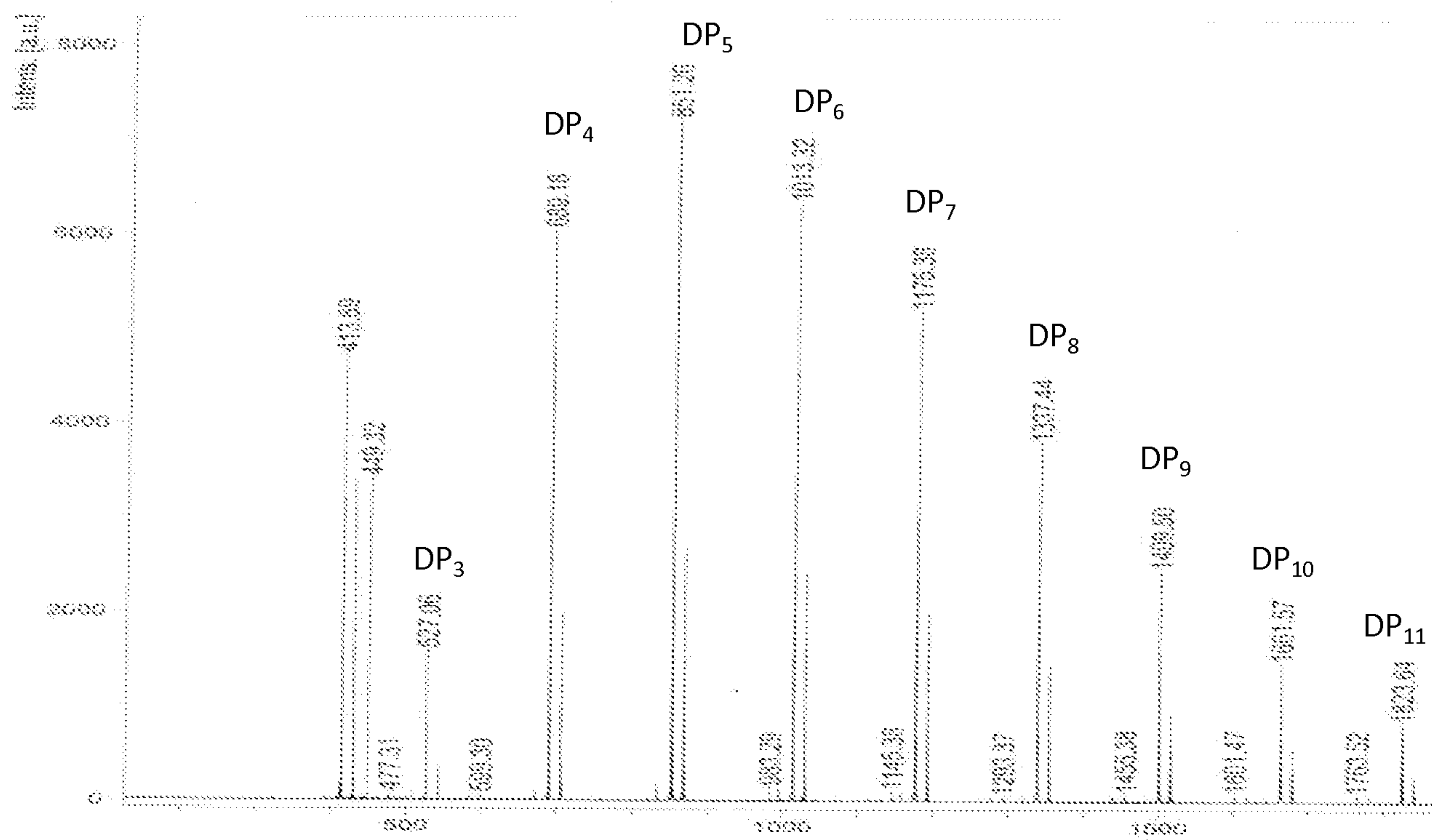


FIGURE 1